

Bacillus 属細菌の芽胞数測定条件に関する研究

加熱温度の影響について

高村一知・星野浩子

Study on Measurement Condition on the *Bacillus* Spores Number

Influence of Heat Temperature

KAZUNORI TAKAMURA and HIROKO HOSHINO

Bacterial spores were heated in boiling water which described in Japan food hygienic standard method. *Bacillus* spores were heated at 70 °C, 80 °C and in boiling water. The condition of 10 minutes in boiling water, the survival spores were *B.licheniformis* IAM 11054, *B.subtilis* IAM 1145, *B.licheniformis* (spice TS-1) and *B.subtilis*(spice TS-2). And, that extinct spores were *B.cereus* IAM 1110 and *B.cereus* (spice TS-3). At the condition of 20 minutes 80 °C, survival percentage of *B.cereus* IAM 1110 and *B.cereus* (spice TS-3) were 92% and 86%, though. Temperature condition of the spore test should be selection of 20 minutes at 80 °C heating.

細胞芽胞の耐熱性は菌種や培養条件によって違っているが、一般には80～100℃程度加熱して生き残るものを芽胞数としている。

そして、食品衛生法で定められた耐熱性細菌数の測定条件では「沸騰水浴中で10分間加熱する」よう規定されている。しかし、耐熱性細菌のうち、好気性芽胞細菌の *Bacillus cereus* (食中毒細菌) 芽胞は比較的熱に弱いので、多くの研究者^{1, 2)}は80℃前後の加熱温度と時間を独自に設定し、生き残るものを耐熱性細菌数としているのが現状である。そこで、耐熱性細菌数の加熱温度は、もっと低い加熱温度に設定したほうがよい、という見地から今回、耐熱性細菌数の測定条件のうち加

熱温度・時間について *Bacillus* 属細菌芽胞を用いて検討したので報告する。

実験方法

I 供試菌株

IAM 標準菌株は東京大学応用微生物学研究奨励会より分与された6菌株と、前報³⁾で香辛料より分離同定した *Bacillus licheniformis* TS-1, *Bacillus subtilis* TS-2および *Bacillus cereus* TS-3を用いた(表. 1)。その他、セレウス菌分離培地を用いて市販の黒・白コショウより分離した *Bacillus cereus* 50菌株を使用した。

Key words : 1) *Bacillus* spores number. 2) heat temperature.
3) measurement condition. 4) *Bacillus* genus.

表.1 供試菌株

<i>Bacillus licheniformis</i>	IAM 11054
<i>Bacillus subtilis</i>	IAM 1145
<i>Bacillus cereus</i>	IAM 1110
<i>Bacillus coagulans</i>	IAM 1115
<i>Bacillus megaterium</i>	IAM 1166
<i>Bacillus pumilus</i>	IAM 12050
<i>Bacillus licheniformis</i>	(spice) TS-1
<i>Bacillus subtilis</i>	(spice) TS-2
<i>Bacillus cereus</i>	(spice) TS-3

II 香辛料中からの *Bacillus cereus* の分離方法

日水製薬(株)製セレウス菌分離用 NGKG 寒天基礎培地を常法に従い溶解し、20%卵黄液を培地に対して10%加えてよく混和し滅菌シャーレに分注し平板とした。この培地に前報⁴⁾と同様の操作で調製したコショウ試験液0.2 mlを培地表面に塗布し、35℃±2で24時間培養した。培養後、卵黄反応陽性の集落を前報⁴⁾と同様に *B.cereus* の同定を行ない確認した。これを市販香辛料より分離した *B.cereus* 50菌株とした。

III 芽胞形成培地および芽胞懸濁液の調製

前報⁴⁾と同様の土壌エキスを寒天培地を用いて、35℃±3で4日間培養後、位相差顕微鏡で芽胞が90%以上形成されていることを確

認した後、この菌集落を生理的食塩水20ml中に白金耳でかき取り、冷凍遠心器8,000r.p.m., 10分間遠心した。この遠心操作を3回行ない芽胞懸濁液を得た。この芽胞懸濁液を0.5ml中に $10^3 \sim 10^4$ 個になるように滅菌生理的食塩水で希釈し2 ml用注射器アンプルに、パステールピペットで入れ、上端をバーナーで封入し、加熱試験に用いた。

IV 加熱試験方法

上記芽胞懸濁液入り、注射器用アンプルのすべての試験菌を、70℃±2で3分間加熱し、栄養細胞を死滅させた。この加熱処理を無加熱0分間とした。そして、この70℃±2で3分間加熱した他の菌株について70℃±2、80℃±2および沸騰水浴中(97℃前後)で加熱処理を5分間隔で60分間まで行なった。冷却後直ちに、常法に従い市販生菌数測定用標準寒天培地を用い、35℃±2で24時間培養を行ない、発生菌集落数を測定した。

実験結果および考察

I 標準菌株および香辛料より分離した菌株 (TS-1, TS-2, TS-3) 芽胞の各温度における生存率 (%)

表. 2, 3, 4に標準菌株および香辛料分離菌株 (TS-1, 2, 3) の70℃, 80℃および沸騰水浴中での芽胞の生残菌数を百分率 (%) で示した。

表.2 *Bacillus* 属細菌芽胞の70℃における生存率 (%)

供試菌株		加熱時間 (分)												
		0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
<i>B.licheniformis</i>	IAM 11054	100	100	80	78	94	96	84	100	100	100	86	80	100
<i>B.subtilis</i>	IAM 1145	100	100	100	100	94	100	91	100	100	100	100	100	100
<i>B.cereus</i>	IAM 1110	100	100	97	86	100	100	100	74	100	94	69	80	86
<i>B.megaterium</i>	IAM 1166	100	74	100	100	89	89	100	63	47	95	100	89	84
<i>B.coagulans</i>	IAM 1115	100	100	100	89	100	94	94	100	87	89	94	95	84
<i>B.pumilus</i>	IAM 12050	100	100	100	75	100	100	75	100	100	100	100	100	100
<i>B.licheniformis</i>	(香辛料) TS-1	100	100	100	100	100	100	100	100	96	100	100	100	100
<i>B.subtilis</i>	(香辛料) TS-2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>B.cereus</i>	(香辛料) TS-3	100	100	92	80	90	100	87	76	85	100	71	83	66

表.3 *Bacillus* 属細菌芽胞の80℃における生存率 (%)

加熱時間（分）															
供試菌株		0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	
<i>B.licheniformis</i>	IAM 11054	100	98	100	100	89	100	92	93	100	100	100	94	100	
<i>B.subtilis</i>	IAM 1145	100	100	87	90	78	63	70	71	65	85	87	92	88	
<i>B.cereus</i>	IAM 1110	100	81	92	77	92	89	83	50	57	42	58	60	63	
<i>B.megaterium</i>	IAM 1166	100	100	97	67	27	32	17	23	17	40	30	29	38	
<i>B.coagulans</i>	IAM 1115	100	99	98	79	42	62	54	43	56	58	63	64	61	
<i>B.pumilus</i>	IAM 12050	100	89	68	45	49	52	48	28	32	23	42	60	62	
<i>B.licheniformis</i>	（香辛料）TS-1	100	100	83	82	81	85	93	57	78	84	78	86	91	
<i>B.subtilis</i>	（香辛料）TS-2	100	95	100	100	100	99	100	100	100	100	100	91	100	
<i>B.cereus</i>	（香辛料）TS-3	100	100	100	86	86	64	44	38	28	31	20	17	22	

表.4 *Bacillus* 属細菌芽胞の沸騰水浴中における生存率 (%)

供試菌株		加熱時間（分）													
		0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	
<i>B.licheniformis</i>	IAM 11054	100	60	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>B.subtilis</i>	IAM 1145	100	36	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>B.cereus</i>	IAM 1110	100	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>B.megaterium</i>	IAM 1166	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>B.coagulans</i>	IAM 1115	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>B.pumilus</i>	IAM 12050	100	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>B.licheniformis</i>	（香辛料）TS-1	100	81	56	12	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>B.subtilis</i>	（香辛料）TS-2	100	96	93	77	72	61	51	49	48	44	32	34	24	
<i>B.cereus</i>	（香辛料）TS-3	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

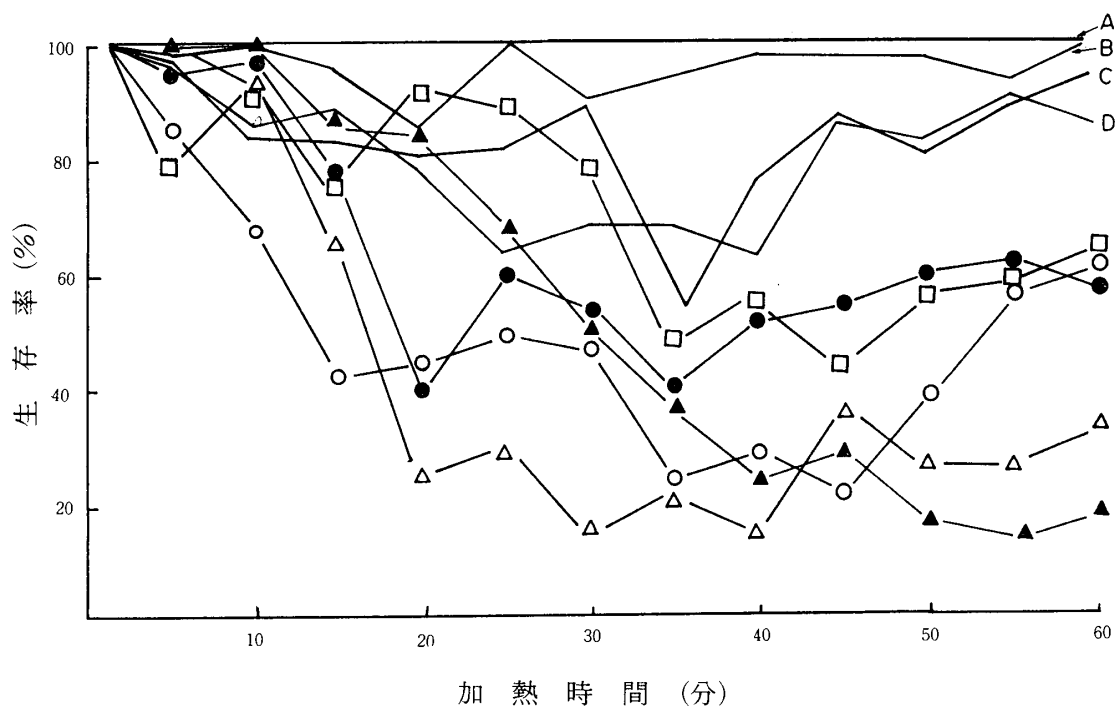


図. 1 *Bacillus* 属細菌芽胞の80℃における生存率 (%)

- (A) *B. subtilis* (spice) TS-2
 (B) *B. licheniformis* IAM 11054
 (C) *B. licheniformis* (spice) TS-1
 (D) *B. subtilis* IAM 1145
- *B. cereus* IAM 1110
 ○ *B. pumilus* IAM 12050
 ● *B. coagulans* IAM 1115
 △ *B. megaterium* IAM 1166
 ▲ *B. cereus* (spice) TS-3

表.5 市販香辛料より分離した *Bacillus* の80℃における生存率 (%)

時 間 (分) No	0	10	15	20	25	30	40	時 間 (分) No	0	10	15	20	25	30	40
1	100	100	100	80	80	70	70	27	100	80	80	60	40	20	40
2	100	100	100	70	60	50	40	28	100	70	60	50	40	20	10
3	100	100	100	60	40	20	20	29	100	100	70	60	40	20	50
4	100	100	100	80	80	60	60	30	100	70	70	50	40	20	20
5	100	100	100	70	60	60	30	31	100	100	60	50	30	40	10
6	100	100	100	70	60	60	30	32	100	10	70	50	50	30	10
7	100	100	100	60	60	60	80	33	100	100	100	40	30	30	50
8	100	100	100	70	40	30	50	34	100	90	80	60	50	40	40
9	100	60	80	60	60	60	50	35	100	100	70	70	60	50	100
10	100	100	70	70	50	50	50	36	100	40	40	20	40	40	40
11	100	100	60	60	100	100	70	37	100	100	70	50	50	40	30
12	100	80	70	50	40	30	30	38	100	70	70	40	40	30	30
13	100	100	100	70	70	70	50	39	100	90	80	40	30	10	50
14	100	100	80	80	80	60	40	40	100	70	30	50	30	50	100
15	100	100	70	70	60	60	40	41	100	80	80	60	30	30	5
16	100	70	60	50	50	80	40	42	100	80	80	50	50	40	20
17	100	80	80	40	40	30	20	43	100	70	70	60	30	10	5
18	100	60	60	40	40	30	20	44	100	100	70	60	60	50	70
19	100	100	60	60	40	40	40	45	100	70	50	50	10	30	30
20	100	100	60	50	50	50	50	46	100	100	80	60	40	20	20
21	100	100	100	40	30	30	20	47	100	100	70	40	30	20	40
22	100	80	80	60	40	30	20	48	100	100	60	50	30	30	20
23	100	80	80	40	40	30	30	49	100	70	80	60	60	50	60
24	100	100	60	60	40	30	30	50	100	100	90	70	40	10	40
25	100	80	60	60	30	20	10								
26	100	70	60	50	40	30	60	平 均		87	75	56	47	40	39
								±	100	±	±	±	±	±	±
								S D		15.5	17.3	12.6	16.8	19.5	22.5

70°C±2では60分間までの加熱に対し、香辛料TS-3が66%と若干低い生存率を示しただけで、他の芽胞菌株は80%以上の生存率であった。この結果から実施した菌株数は少ないが、標準菌株および香辛料分離菌株(TS-1, 2, 3)は70°C±2, 60分間加熱では、ほとんどの芽胞が生存していることがわかった。

80°C±2での加熱では図. 1(表. 3をグラフとした)で解るように加熱経過時間が20分と35分で変化が見られる。20分では *B. megaterium* IAM 1166, 27%, *B. coagulans* IAM 1115, 42%および *B. pumilus* IAM 12050, 49%と前者2菌株は比較的熱に強い菌株にもかかわらず低い生存率を示した。特に *B. coagulans* は缶詰などから検出される耐熱性菌として知られているが、IAM 1115は熱に弱かった。35分を越える加熱では、前記3菌株に加えて *B. cereus* の標準菌株 IAM 1110 50%と香辛料分離菌株TS-3 38%と生存率が低下した。他の *B. licheniformis* IAM 11054とTS-1, *B. subtilis* IAM 1145とTS-2の各菌株は80°C, 60分間で88~100%の生存率を示し、この加熱温度と時間では、ほとんど死滅しなかった。

次に沸騰水浴中での結果を表. 4に示した。沸騰水浴中5分間では、*B. licheniformis* IAM 11054, 60%, TS-1, 81%, *B. subtilis* IAM 1145, 36%, TS-2, 96%, *B. cereus* IAM 1110, 29%および *B. pumilus* IAM 12050, 7%で他の *B. megaterium* IAM 1166, *B. coagulans* IAM 1115, *B. cereus* TS-3は0%と生残芽胞はなかった。食品衛生法で定められている沸騰水浴中10分間の加熱では *B. licheniformis* IAM 11054, 35%, TS-1, 56%, *B. subtilis* IAM 1145, 45%, TS-2, 93%の生存率を示し、食中毒細菌 *B. cereus* の標準菌株および香辛料分離菌株TS-3は、ともに沸騰水浴中10分間では生残菌株0%であった。この結果は著者らが行った「市販香辛料中の *Bacillus* 属細菌」の報告³⁾と同様の結果となっている。つまり、沸騰水浴中10分間加熱して残る芽胞菌は、*B. licheniformis* と *B. subtilis* のみであった。

II 市販香辛料より分離した50菌株の *B. cereus* の80°Cにおける生存率(%)

実験方法IIで香辛料より分離した50菌株の *B. cereus* について、上記結果をもとに80°Cにおける芽胞の生存率を表. 5に示した。50菌株の各加熱時間における平均値を計算したところ、10分間=87±15.5%, 15分間=75±17.3%, 20分間=56±12.6%, 25分間=47±16.8%, 30分間=40±19.5%, 40分間=39±22.5%であった。

香辛料より分離した *B. cereus* 菌株が標準菌株より耐熱性が20分以上低いのは、実験前までに相当芽胞が損傷を受けていることが考えられる。

以上の実験結果から、食品衛生法に定められている耐熱性細菌数測定法の「沸騰水浴中で10分間加熱する」という加熱条件は高温すぎる。昭和57年3月に *B. cereus* は新たに認定された食中毒細菌であり、また、この細菌による食中毒発生も起きていることを考慮すると、耐熱性細菌数測定法の加熱温度条件を *B. cereus* だけでも80°C, 30分間に規定することを提案したい。

今回の実験結果を表現するにあたり生存率%を使用した。一般に微生物の耐熱性試験の結果を表現する方法として、90%死滅率D値や、この概念を拡大した加熱減少時間 TRT 値があるが、一般的に理解しやすいという考えから生存率%を用いた。しかし、専門的な見方はD値を逆に使用したことになる。

要 約

食品衛生法に定められている耐熱性細菌数の測定条件は「沸騰水浴中で10分間加熱する」と規定されている。この加熱条件では *B. cereus* などの食中毒細菌芽胞には高温すぎて死滅してしまうのではないかと、という見地から、加熱温度および時間について、*Bacillus* 属細菌芽胞を用いて検討を行った。

1. *Bacillus* 属細菌芽胞標準菌株および香辛料分離菌株(TS-1, TS-2, TS-3)の沸騰水浴中で10分間加熱した結果、生残菌株は *B. li-*

cheniformis IAM 11054, *B.subtilis* IAM 1145, *B.licheniformis* 香辛料分離菌株 TS-1 および *B.subtilis* 香辛料分離菌株 TS-2 だけであった。*B.cereus* など他の 4 菌株の芽胞は死滅していた。一方、 $80^{\circ}\text{C} \pm 2$ の加熱温度では、試験菌株の芽胞すべてが 60 分間、22~100% の生存率を示した。

2. 市販香辛料より 50 菌株の *B.cereus* 細菌芽胞を分離して、 80°C における耐熱性試験を行った結果、20 分間で $56 \pm 12.6\%$ の生存率を示した。これらの結果から耐熱性細菌数測定 of 加熱温度条件を食中毒細菌が検出できるような低い温度条件に変更することを提案する。

本研究は第 48 回食品衛生学会福井大会で発表した。

文 献

- 1) 神保勝彦, 小久保彌太郎: 東京衛研年報., **33**, 161 (1982).
- 2) 楠 淳, 池島伸至, 新井輝義, 神真知子, 入倉善久, 友成正臣, 伊藤武, 坂井千三: 東京衛研年報., **28**, 11 (1977).
- 3) 高村一知, 渡部智子: 聖徳栄養短大紀要., **13**, 7 (1982).
- 4) 高村一知, 星野浩子: 聖徳栄養短大紀要., **15**, 31 (1984).